

公表特許公報(A)

昭63-500805

公 表 昭和63年(1988)3月24日

明 示 文 字	識別記号	庁内整理番号	審査請求	公 表
C 18 B 37/00		C-6718-4C	予備審査請求	新 門 (区分) 3 (3)
A 51 K 31/725	ADU	7252-4C	未請求	
	ADZ	7252-4C		
C 12 P 19/04		C-6515-4B※		(全 25 頁)

発明の名称 可溶性リン酸化グルカン

特 許 昭61-504604

特許文提出日 昭62(1987)4月20日

出 願 昭61(1986)8月18日

出 願 際 出 願 PCT/US86/01646

特許公開番号 WO87/01037

出 願 際 公 開 日 昭62(1987)2月26日

優先権主張 ◎1985年8月19日◎米国(US)◎707368

発 明 者 ジルジエ、ニコラス アル アメリカ合衆国 ルイジアナ州 70066 グレタテ フェアフィー
出 願 人 ジ アドミニストレイターズ アメリカ合衆国 ルイジアナ州 70012, ニューオールリーンズ テ
オブザ ナチュレン エデュ ユーレン アベニュー 1430
ケイシヨナル フアード
代 理 人 弁理士 八 田 幹 雄 外1名
特 許 范 囲 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB
(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最 終 頁 に 掲 ぐ

特 許 范 囲 の 説 明

- (a) 水または水性溶液への溶解能力;
(b) 非毒性、非免疫原性および実質的病原性
および
(c) 動物またはヒトにインビボ投与された際に顕著
な免疫バイオリジ反応を及ぼす能力
を特徴とするリン酸化ポリマー〔β-(1-3)グルコピラノ
ス〕鎖から成る可溶性グルカン。
2. 免疫原性誘導スペクトロスコピーで測定された時に実質
的に完全な三重らせん構造がないことをさらに特徴とする諸
家の結晶性1項に記載の可溶性グルカン。
3. リン酸化度が約1.4%〜約3.4%の範囲であること
をさらに特徴とする請求の範囲第1項に記載の可溶性グル
カン。
4. 分子量が約10,000〜約100,000ダルトンの範囲であること
をさらに特徴とする請求の範囲第1項に記載の可溶性グル
カン。
5. 分子量が約100,000〜約500,000ダルトンの範囲であること
をさらに特徴とする請求の範囲第1項に記載の可溶性グル
カン。
6. 可溶性グルカンが細胞毒素から作られる請求の範囲第1
項に記載の可溶性グルカン。
7. 微生物菌がサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomy
ces cerevisiae)から成る請求の範囲第6項に記載の可溶

性グルカン。

- 微生物菌がコリオラス ベルケカラ(Corliolus ver
ticillatus)から成る請求の範囲第6項に記載の可溶性グル
カン。
9. (a) 水または水性溶液への溶解能力;
(b) 非毒性、非免疫原性および実質的病原性
および
(c) 水環境で動物またはヒトにインビボ投与された
際に顕著な免疫バイオリジ反応を及ぼす能力
を特徴とするリン酸化ポリマー〔β-(1-3)グルコピラノ
ス〕鎖から成る可溶性グルカン。
10. ポリ〔β-(1-3)グルコピラノース〕鎖は免疫原
性誘導スペクトロスコピーで測定された時に実質的に完全な
三重らせん構造を有しないことをさらに特徴とする請求の範
囲第9項に記載の可溶性グルカン。
11. ポリ〔β-(1-3)グルコピラノース〕鎖のリン酸
化度が約1.4%〜約3.4%の範囲であることをさらに
特徴とする請求の範囲第9項に記載の可溶性グルカン。
12. ポリ〔β-(1-3)グルコピラノース〕鎖の分子量
が約10,000〜約100,000ダルトンの範囲であること
をさらに特徴とする請求の範囲第9項に記載の可溶性
グルカン。
13. ポリ〔β-(1-3)グルコピラノース〕鎖の分子量
が約100,000〜約500,000ダルトンの範囲であること

あることをさらに特徴とする請求の範囲第9項に記載の組成物。

14. 腐敗物が微生物群から得られる請求の範囲第9項に記載の組成物。

15. 腐敗物がサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から成る請求の範囲第14項に記載の組成物。

16. 腐敗物がコリオラス・ベルシカラー (*Coriolus versicolor*) から成る請求の範囲第14項に記載の組成物。

17. 請求の範囲第1項に記載の組成物または部分的な有酸素の可溶性グルカンおよび生進平均に許容可能な塩化から成ることを特徴とする動物またはヒトにおける感染の予防または治療用製剤組成物。

18. 感染に対して有効なバイオ活性剤をさらに含有する請求の範囲第17項に記載の組成物。

19. 請求の範囲第1項に記載の組成物上有酸素の可溶性グルカンおよび生進平均に許容可能な塩化から成ることを特徴とする動物またはヒトにおける慢性炎症性腸病用製剤組成物。

20. 抗生物質をさらに含有する請求の範囲第19項に記載の組成物。

21. 抗生物質がシクロホスファミドからなる請求の範囲第20項に記載の組成物。

22. (a) 微粒子グルカンまたはグルカンタンパク質

集合体とカイトロビク素を含む腐敗性菌に溶解し、

(b) 合成された溶解グルカンをリン酸と反応させて可溶性リン酸グルカンを形成させ、そして

(c) その腐敗性菌から生成された可溶性リン酸グルカンを回収することを特徴とする

動物またはヒトにインビネ投与された際に顕著な免疫バイオリジ反応を誘起する毒性、非免疫抑制性、實質的に非発熱性の可溶性リン酸グルカンの製造方法。

23. 腐敗性腐敗物がサッカロミセス・セレビシエから成る請求の範囲第22項に記載の方法。

24. 強力カイトロビク素が原料から成る請求の範囲第22項に記載の方法。

25. (a) 微粒子グルカンまたはグルカンタンパク質集合体を強力カイトロビク素を含有する腐敗性菌に懸濁させて混合物を形成させ、

(b) その混合物を約50〜150℃で加熱し、

(c) リン酸をその混合物に加え、

(d) その混合物を50〜150℃で約1〜12時間反応させる連続段階からなる方法により微粒子グルカンまたはグルカンタンパク質集合体を溶解させる請求の範囲第22項に記載の方法。

26. その混合物を約100℃に加熱させる請求の範囲第23項に記載の方法。

27. その混合物がサッカロミセス・セレビシエ中の約4〜12Mの濃度を含む請求の範囲第25項に記載の方法。

28. 合成された可溶性リン酸グルカンのリン酸化度が實質的に完全なようにグルカンはリン酸と十分な可溶性塩を形成する請求の範囲第22項に記載の方法。

29. (a) 可溶性リン酸グルカンを溶解させ、

(b) 十分量の水を加えて広範囲可溶性リン酸グルカンを溶解させ、そして、

(c) 約10,000ダルトン分子重以下の成分を除去させる

ことにより可溶性リン酸グルカンを回収する請求の範囲第22項に記載の方法。

30. 微粒子グルカンがサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から得られる請求の範囲第22項に記載の方法。

31. グルカンタンパク質集合体がコリオラス・ベルシカラー (*Coriolus versicolor*) から得られる請求の範囲第22項に記載の方法。

32. (a) アリコートの腐敗細菌を水酸化ホウ酸に懸濁させて混合物を形成し、

(b) その混合物を約50〜150℃に加熱し、

(c) 生じた腐敗物から上澄を除去し、

(d) 残留物を水酸化ホウ酸に懸濁させ、

(e) ステップ (b) および (c) を2または3回

繰返す。

(f) 追加ステップ (e) の残留物に加えて腐敗性混合物を形成させ、

(g) 腐敗性混合物を加熱し、

(h) 上澄を除去し、

(i) ステップ (f) と (g) を2回繰返し、

(j) 腐敗物を水洗し、

(k) 残留物を上澄が實質的に無色となるまでエタノールで連続して洗浄し、そして

(e) 形成された可溶性ポリグルコースを単離する

ステップから成る方法により微粒子グルカンを得る請求の範囲第22項に記載の方法。

33. 請求の範囲第1項に記載の組成物の乾燥した可溶性リン酸グルカンを動物またはヒトに投与することを特徴とする動物またはヒトにおける感染治療方法。

34. 感染が細菌によって起こされる請求の範囲第33項に記載の方法。

35. 細菌がスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、マイコバクテリウム・チューバクルオシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、ヘモフィル・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*)、ディプロコッカス・ニューモニエ (*Diplococcus pneumoniae*)、エ

特表第83-500805(3)

シェリキア・コリ (Shigella flexneri)、バクテリウム・エンテリカス (Bacterium enteritidis)、フランシセラ・ツラレンシス (Francisella tularensis) およびマイコバクテリウム・レプレ (Mycobacterium leprei) から成る群から選ばれる請求の範囲第34項に記載の方法。

36. 感染がウイルスにより起こされる請求の範囲第33項に記載の方法。

37. ウイルスが単独性疱疹または肝炎である請求の範囲第36項に記載の方法。

38. 感染が菌類により起こされる請求の範囲第33項に記載の方法。

39. 菌類がカンダ・アルビカンス (Candida albicans) またはスポトリウム・シェンキイ (Sporotrichum schenckii) から成る請求の範囲第38項に記載の方法。

40. 感染が寄生虫体により起こされる請求の範囲第33項に記載の方法。

41. 寄生虫体がレイシマニア・ドノバニ (Leishmania donovani) またはシストマ・マンソニ (Schistosoma mansoni) である請求の範囲第40項に記載の方法。

42. 請求の範囲第1項に記載の治療上有効性の可溶性リン酸化グルカンを含むまたはヒトに投与することを含むとする動物またはヒトにおける感染防止方法。

43. 感染が細菌によって起こされる請求の範囲第42項に記載の方法。

1) である請求の範囲第49項に記載の方法。

51. グルカンが肺野内、腹腔内、皮下、腔口、腸腔内に挿入後または吸入後とされる請求の範囲第33項または42項に記載の方法。

52. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンと感染に対して有効な免疫抑制剤を混合してなる治療上有効性の組成物を動物またはヒトに投与することを含むとする動物またはヒトにおける感染防止方法。

53. 組成物が肺野内、腹腔内、皮下、腔口、腸腔内に挿入後または吸入後とされる請求の範囲第52項に記載の方法。

54. 請求の範囲第1項に記載の予防または治療上の有効性の可溶性グルカンを含む動物またはヒトに投与することを含むとする動物またはヒトにおける感染防止方法。

55. 請求の範囲第1項に記載の治療上有効性の可溶性リン酸化グルカンを含む動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

56. 可溶性リン酸化グルカンが肺野内、腹腔内、皮下、腔口、腸腔内に挿入後または吸入後とされる請求の範囲第54項または55項に記載の方法。

57. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止

44. 菌類がスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae)、マイコバクテリウム・テューバクルオシス (Mycobacterium tuberculosis) ヘモフィラス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae)、ディプロコッカス・ニューモニエ (Diplococcus pneumoniae)、シェリキア・コリ (Shigella flexneri)、バクテリウム・エンテリカス (Bacterium enteritidis)、フランシセラ・ツラレンシス (Francisella tularensis) およびマイコバクテリウム・レプレ (Mycobacterium leprei) から成る群から選ばれる請求の範囲第43項に記載の方法。

45. 感染がウイルスにより起こされる請求の範囲第42項に記載の方法。

46. ウイルスが単独性疱疹または肝炎である請求の範囲第45項に記載の方法。

47. 感染が菌類により起こされる請求の範囲第42項に記載の方法。

48. 菌類がカンダ・アルビカンス (Candida albicans) またはスポトリウム・シェンキイ (Sporotrichum schenckii) から成る請求の範囲第47項に記載の方法。

49. 感染が寄生虫体により起こされる請求の範囲第42項に記載の方法。

50. 寄生虫体がレイシマニア・ドノバニ (Leishmania donovani) またはシストマ・マンソニ (Schistosoma mansoni) である請求の範囲第49項に記載の方法。

51. 請求の範囲第1項に記載の治療上有効性の可溶性リン酸化グルカンを含む動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

52. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンと感染に対して有効な免疫抑制剤を混合してなる治療上有効性の組成物を動物またはヒトに投与することを含むとする動物またはヒトにおける感染防止方法。

53. 組成物が肺野内、腹腔内、皮下、腔口、腸腔内に挿入後または吸入後とされる請求の範囲第52項に記載の方法。

54. 請求の範囲第1項に記載の予防または治療上の有効性の可溶性グルカンを含む動物またはヒトに投与することを含むとする動物またはヒトにおける感染防止方法。

55. 請求の範囲第1項に記載の治療上有効性の可溶性リン酸化グルカンを含む動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

56. 可溶性リン酸化グルカンが肺野内、腹腔内、皮下、腔口、腸腔内に挿入後または吸入後とされる請求の範囲第54項または55項に記載の方法。

57. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

58. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

59. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

60. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

61. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

62. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

63. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

64. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

65. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

66. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

67. 請求の範囲第1項に記載の可溶性リン酸化グルカンの治療上の有効性を証明し、それを動物またはヒトに投与することを含むとする動物およびヒトにおける感染防止方法。

因子のインビトロ生産方法。

65. 請求の範囲第63項または64項の発明に基いて生産された可溶性細胞膜タンパク質は細胞膜因子。

可溶性リン酸化グルカン

1. 病原性

本発明は、新規クラスの可溶性グルカン類に関する。更に詳しくは、本発明は、サッカロミセスセレンシエ (*Saccaromyces cerevisiae*) およびコリオサスバシラ (*Dothidea variicolor*) のような各種微生物から新規可溶性リン酸化グルカン類を調製する方法のほかにポリ- β - $(1\rightarrow2)$ グルコピラノース類が選々の程度にリン酸化されている可溶性リン酸化グルカン類に関する。本発明の新規可溶性リン酸化グルカン類は、非毒性、非抗原性、免疫的に非毒性であり、動物およびヒトにインビロ (*in vivo*) の様とされる際非毒性免疫バイオリガンドの応用を示し、そしてその最も確かなる活性が他の免疫活性剤の活性化を助けるマクロファージ活性の免疫刺激である。さらに、これら可溶性リン酸化グルカン類は、インビロ (*in vitro*) でリン酸化作用に対してと同様にインビロで免疫系および内臓系に対して免疫調節作用を示す。

2. 病原性

「グルカン」と称する物質は、セルロース、アミロース、グリコゲン、ラミナリアン類 (*laminarians*)、デンプン等のポリマー類を含有する、各種の天然に生ずる多糖類

またはポリグルコース類を一般に包含する。グルカンは、 α または β 型のいずれかで、1-3、1-4、および 1-6 のグルコシド結合によりリンクされた単糖または寡糖残基のグルコース単位を含む。

ここで定義するように、「微粒子グルカン」は、イーストサッカロミセスセレンシエの細胞壁から誘導されたような非水溶性微粒子 (約 1~3 μ) ポリグルコースを示す。微粒子グルカンは、塩分分子であり、カチオン β -1-3 グルコシド結合により単位化された鎖状グルコピラノース単位から成っている。【バッシュ等., 1941, ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ **63**: 295~298頁; ウルグ等., 1979, インターナショナル ジャーナル オブ キンター **24**: 773~779頁 (Rossid *et al.*, 1941, J. Amer. Chem. Soc. **63**: 295-298; Di Luzio *et al.*, 1979, Int'l J. Cancer **24**: 773-779)】。X線結晶学研究においては、微粒子グルカン類が三螺旋らせん (triple-stranded helices) 形態で存在することが示された【サーコ等., 1938, バイオケミカル ソサイエティ トランスアクション **11**: 138~142頁 (Sarko *et al.*, 1938, Biochem. Soc. Trans. **11**: 139-142)】。

2. 1. 微粒子グルカン類の免疫バイオリガンド活性

微粒子グルカンは、リンパ系細胞と関係するマクロファージ・樹状細胞、抗体の産生誘導物質である。このよ

うに、微粒子グルカンは、組織内免疫および免疫系の両者に十分な効果を示した。

以前の研究においては、微粒子グルカンの各種実験動物へのインビロ投与が次のことを含む多くの十分免疫バイオリガンド効果を誘導することを示した：

- (1) 組織系およびマクロファージ系の増殖の誘導【デエイマンとフタヒミ, 1975, ジャーナル オブ イクスプレメンタル メディシン **110**: 853~859頁; アッシュワース, 1963, イクスプレメンタル モレキュラー バイオロジー, サプリメント **1**: 83~103 (Eshman and Fahlst, 1975, J. Exper. Med. **139**: 853-857; Ashworth *et al.*, 1963, Exper. Molec. Pathol., Suppl. **1**: 93-103)】;
- (2) マクロファージ免疫増進の高価【リビとスルツオ, 1975, アメリカン ジャーナル オブ ファイジオリジ, **200**: 297~300頁 (Ridgely and Slutzky, 1975, J. Physiol., **250**: 297-300)】;
- (3) マクロファージ分泌活性の高価【バーリン等., 1971, イン ヘテロジェニティ オブ モノクローナル ファゴサイトシス, フォースター アンド ワイディ, エッド., アカデミック プレス, ニューヨーク, 243~252頁 (Berlin *et al.*, 1971, in Heterogeneity of Monoclonal Phagocytes, Forster and Landy, eds., Academic Press, New York, pp. 243-252)】;
- (4) マクロファージサイズの増大【バッチェンとロツフ

一六、1980, イクスプレシメンタル ヘマトロジー 8; 4
09~422頁 (Patchen and Loizova, 1980, Exper. Gerontol
8: 409~422) ;

(5) マクロファージ付着および定住細胞の高集 ニスカネン等, 1978, キャンサー リサーチ 38: 1406-1409 (Niskanen et al., 1978 Cancer Res. 38: 1406-1409).

(1989)；そして
 (5) 確率係数北の高峯（グロブスキー等，1963，*ジャーナル オブ レディクニクランドセリアル ソサイアティン* 33：467～473等；[Slovaký et al., 1963, *J. Natl. Geol. Inst.* Soc. 33：421-431]）。確率係数に
 対する相対偏差率の算出は、インビボ（マルセルとワ
 ルタオ，1976，*イン・ザ マクロファージ イン ネオ
 ブラシア*），フクシ等，アカデミック プレス，ニュー
 ヨーク 272～283等；[Matsuno and Fukushi, 1976, *Am. J. Pathol.* 108：272-283]）による。

「The Macrodynaps in Neoplasia」, Fink, ed., Academic Press, New York, pp. 227-243) およびイン ビトロ
【チリビ等, 1978, キンサン リサーチ, 32: 1055
→1091頁 (Chirigvis et al, 1978, Cancer Res., 38: 30
65-3081)】の理窟において数種のゾルガンに阻害された
動物およびヒトからのマクロファージ系で示された。
数種のゾルガンのイン ビトロによる細胞成長系の誘
発、阻害時の放散阻害剤と数種の動物において細胞毒性
は癌腫形成の発症機序に寄与を抑制する【例えばワールスと

ジョルジオ。1964, アロシエーティンガ ソサイエティ
オブ イクスペリメンタル バイオロジカル メディシン
115: 756 ~ 759 (1964, 9, 9). *Medias and J. Luzzio*,
1964, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 115: 756-759 (参
照のこと)。この見解は、正常値が造作的にホストと異な
るならばグルガンが正常組織に対してホスト防衛機構を

腸癌の発生系および免疫反応の形成に對して、微生性グルカンのインビオ活性が、免疫系の発育期から腫瘍形成に至るまでの多様な細胞形態、細胞表面の受容体結合を容易ならしめることを示した [Patchen et al., 1983, サーベイオ イムノロジカル リサーチ]: 237-242 (Patchen, 1985, Surg. Immunol. Res.: 237-247)。

数多くの研究において、強性グルカンのインビオ効果は、咽頭、膀胱、大腸、小腸及び生殖器系生物により発揮される各種の産生・作用にわたるホスト抵抗性を向上させることが示された。特に、癌病に対してホスト抵抗性の高添は、癌病がエシェリキア・コリ (Escherichia coli)、スタフィロкокサス・アルブス (Staphylococcus aureus)、マイコプラズマ・フラウレンシス (Mycoplasma flaurensii), フラニセバクテリウム・レバ (Flavobacterium tularensis), ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae), カンジダ・アルベicans (Candida albicans) など、スポロトリウム・シュベチ (Sporotrichum schubertii)

のような誤名を誤認、同様にベニスエラン エキネ エンゼファロミリアティス ウイルス (Venezofelan equine encephalomyelitis virus)、リットバレルエンフェリス、マウス脳炎ウイルス、フログ ウィルス等 (frog virus) 等、単純ヘルペス I および II のようなウイルス類、およびレプティマニア ノドニカ (leishmania donovani) (クローン、1985、トレンズ (in Farnham 1983、Trends in Pharmacol. Sci. 4: 344-347) およびそこに引用されている文献を参照のこと) のような寄生動物により感染された動物にも見られた。

仮説を研究し、根拠がゲルカンが有状態と復元適性性と有することを示した。例として、根拠がゲルカンではアミノ酸ノーマ（第4巻）891-923, アナラッシュ・カナルノマ（第2版）1509A, ノーマノマ（第2版）316 および血球凝集反応による血球凝集167【リゴネオ、1919、インドアンシス・インバ、イグベムタルメタル メディンランド バイロノミ、ホメル、1214:169~260頁】(J. Lisc は [in situ](#), 1979: [Advances in Experimental Medicine and Biology](#), Vol. 1218: 269-295) を含む4つの相対的遺伝子座型をゲルカンについて歴史的観点および良好な生存率を予測することを示した。

細胞基体の炭酸子がグルカンの両種希酸性評価のために、
対照および糖質不グルカン形成マウスから緊密された脂肪

マクロアミン類の抗腫瘍作用の相対性が研究された【ヤンセルとグズカ、1978、イン サイクルファージ
イン ニュクリアー、フリンク、マカニョックプレス、
ニューヨーク、227~243頁【Hansell and Uziel, 1978、
p. 10. In The Macrophage in neoplasia, Flinck, ed. Scand
nic Press, New York, pp. 227-243】】。これらの研究に
より、グルガン型マクロファージの経皮性マクロファージ原は
正常なマクロファージに比較して顕著な抗癌作用をマウスに
産生することが示された。この研究が複製された【南スベ
ーデン等、1981、イン ヘテロフェニール オブ
モノニュクリアー フォトサイエス、フレイスター アンド
ランディー、エド アカデミク プレス、ニユー
ヨーク、243~262頁およびチグリス等、1978、キャンセ
ーリサーチ 23: 1085-1093頁【See, e. g., Birlik et
al., 1981, In Heterogeneity of Macromolecular Phagoc
ytosis, Ferster and Denoy, eds., Academic Press, New Yo
rk, pp. 243-252】 and Chirigos et al., 1978, Cancer R
es. 38: 1088-1093の表の上】

先に養種子グルカンでインキュベートした胚嚢、胚嚢細胞を使用するインビトロ研究は、グルカンが肉胞および無色（色）胚嚢細胞に直接細胞増殖抑制効果を表わし、かつ、正常な胚嚢および母嚢細胞間に胚嚢効果を示唆することを示した（ウィリアムス等, 1985, *ヘパトリジャー*, 5, 130-206）
[Williams et al., 1985, *Hepatology*, 5, 130-206]

が得られた。

アセチル化と縮合にホスフェートまたはサルフェート基の添加により糖鎖子グルカンの中性グルカン鎖を酸性糖鎖に転換する試みも失敗した。これら工程の各々は糖鎖子グルカンの糖鎖部分M50により制御され、各例において糖鎖子グルカンは得られた。

3. 糖鎖の制御

グルカンの三重らせん装が固の各々の反応を制御するよう十分に短めの方針の製法的な研究の間に、糖鎖子グルカンの（糖鎖のような）強いカオトリック鎖の存在下において（DM50のような）高糖基溶媒に溶解する際に、グルカンは機能的に十分に分裂させられて糖鎖（またはストランド）の各々のリン酸化反応を容易にし、生じたリン酸化グルカンは糖鎖子グルカンの特性三重らせん構造が実質的に完全に存在しないことを示した。生じたリン酸化グルカンの糖鎖は、水に溶解するところ、非毒性、非免疫原性、実質的な非免疫原性および動物およびヒトにインビタで投与される時に顕著な免疫バイオリジック反応を行うことを示す。

これらの発見に基づいて本発明は、(a)ポリ〔β-(1→3)-D-グルコピラノース〕鎖がさまざまな程度にリン酸化され；(b)非毒性、非免疫原性、実質的な非免疫原性；および(c)動物およびヒトにインビタで投与された場合に顕著な免疫バイオリジック反応をすることができると認められるクラスの可能性リン酸化グルカン類を提供する。これら新

規な可能性リン酸化グルカン類は、さらに糖鎖子グルカン類の三重らせん構造の實質的な存在、組織内浸透および免疫系の他の免疫活性細胞の活性化を生じさせる免疫刺激マクロファージ活性により特徴づけられる。更にこれら可能性リン酸化グルカン類は、それに限定されないが、自食滅生作用を含む免疫活性を高める。これら可能性リン酸化グルカン類は、インビタで投与および経口投与に、インビタでリン酸化血漿に対して糖鎖免疫刺激作用を示す。これら可能性リン酸化グルカン類はインビタでマクロファージ細胞を刺激するばかりでなく、インビタで投与したマクロファージ細胞に顕著な免疫刺激を與へる。マクロファージ細胞のかかる免疫刺激は、マクロファージ細胞毒性/巨噬細胞増殖性因子(MCT)、炎症的に過剰、特に炎症に寄与する未熟構造のコンパクシスまたはタンパク質の生産を必要物に伴う。

加えて、本発明は（他の微生物源を使用してもよい）好ましくはヤッコウ鼠クセレピシエから生産された糖鎖子グルカンを強カオトリック鎖を含む高糖基溶媒中に溶解し、生じたグルカンゼリン酸と反応させて可能性リン酸化グルカンを形成させ、そして反応混合物から生じたリン酸化グルカン類を回収するこのような可能性リン酸化グルカン類を調製する方法を提供する。

更に、本発明は、糖鎖、脂質、ウイルス膜および生体材料により誘導された糖鎖を可能性リン酸化グルカンま

たに動物またはヒトに生体学的に許容可能な経路と組合せて可能性リン酸化グルカンから成る製剤組成物を投与することによる治療および予防に便する方法を提供する。その上、それらの方法はそれらの特性により誘導された感染の治療に適用にその感染に対して有効なバイオ活性剤と組合せた有効な可能性リン酸化グルカンを投与することにより提供される。

その上、本発明は治療上有効な可能性リン酸化グルカン類または糖鎖類と組合せて動物またはヒトに投与することにより慢性新生成病の回避方法を要する。本発明は、糖鎖に、脂質と組合せて腎臓の可能性グルカン類を動物またはヒトに投与することにより、抗癌剤の投与により誘導された白血球減少症の予防方法を提供する。

更に、本発明は動物およびヒトマクロファージ細胞を刺激して可能性細胞増殖/細胞増殖因子(MCT)を生産・分泌する方法およびそのように調製された生物物を提供する。更に、MCTは可能性リン酸化グルカンを動物またはヒトに投与若しくは動物またはヒトマクロファージ細胞を可能性リン酸化グルカンを含有高糖基溶媒中にインビタで投与することにより調製される。

本発明の可能性リン酸化グルカンの特性は、

(1) グラム陰性細菌感染を抑制し死亡率を減低させる効果；(2) グラム陰性細菌感染を抑制し死亡率を減低させる効果；(3) 顕著に免疫抑制された動物およびヒトにお

ける感染発生率の死亡率を減低する効果；(4) グラム陰性細菌感染に対する免疫抑制された動物およびヒトの感受性の差を減低する効果；(5) ウイルス感染を顕著に加速する効果；(6) 菌叢および他の微生物増殖により誘導された自然発生感染を増強する効果；(7) 腫瘍で侵襲した宿主に初期発生感染を抑制し、其効果と組合せて使用された場合に増殖抑制剤に対し相乗効果を示す効果；(8) 動物およびヒトの結核外傷と同様に初期発生外傷の進行に清浄な和緩的に作用する効果を含む。

これらの特性の特性のため可能性リン酸化グルカン類は、多くの宿主条件と結合に、糖鎖、ウイルス、脂質および生体材料により誘導された各種の状況に対して予防および治療上の適用に資するものである。可能性リン酸化グルカン類は、生体学的に許容可能な製剤組成物とともに、単独でまたは他のバイオ活性または薬理的に關する製剤および治療と組合せて有効に使用してもよい。

4. 糖鎖調製法説明

本発明は、次の本発明の糖鎖を説明、本発明の実施態様および他の例を参照してさらに一分理解されるものである。

第1図は、27%の濃度における可能性リン酸化グルカンの糖鎖成分成分ベクトル図である。

第2図は、市販のレンナン製剤（味の素（株）製、日本国）の糖鎖成分成分ベクトル図である。第2図は、

40倍/倍率において得られたスペクトル図である。第2図は、3倍/倍率にシアン素において得られたスペクトル図である。

第3図は、第2図可溶性リン酸化グルカン注射を受けたコルチコステロイド合成抑制マウスの生存率を示す図である。尚ほ第3図は正常マウスの生存率に対して可溶性グルカンの投与量と結果を示す。

第4図は、正常およびコルチコステロイド免疫抑制マウスのエシェリキアコリ (Escherichia coli) 感染後の可溶性リン酸化グルカンのインビトロ消化率を示す図である。

第5図は、その後発的に得られたスタフィロコッカス・アウレウス感染の致死効果に対する可溶性リン酸化グルカンの予防効果を示す図である。

第6図は、その後発的に得られたウィルス性肺炎マウスの生存率に対する可溶性リン酸化グルカンの効果の致死率を示す図である。

第7図は、実験的に得られたカンガ・アルビカンズ肺炎マウスの生存率に対する可溶性リン酸化グルカンの効果の致死率を示す図である。

第8図は、インターロイキン1(IL-1)産物に対する可溶性リン酸化グルカンの効果を示す図である。

第9図は、可溶性リン酸化グルカン誘発性マクロファージ増殖から得られた細胞増殖抑制性/細胞増殖抑制因子が分子重さ36,500および84,000ダルトンの二つ

の主要なフラクションから成ることを示す図である。

5. 本発明の試験例

5. 1. 可溶性リン酸化グルカンの製法例

水性可溶性リン酸化グルカン、前記のいずれの他のグルカン類と異なる従来の方法を主とする方法によって得られる。

本発明の好適な実施例に従って可溶性リン酸化グルカンは次のように調製される：サッカロミセスセビシエから得られた中性ポリグルコースである中性グルカン、一定に溶解しながらサッカロミセスセビシエ(DMSO)のような非プロトン性(solvent)溶媒中の強力オトミック超音波中で溶解せられる。強力オトミック溶媒は、ポリグルコース塩に於て水素結合を壊め、そして分子を解しない。水素結合の再形成防止のために約4~12M程度の濃度の適当なかなり高濃度の強力オトミック溶媒を使用することが好ましい。その混合物を、その後、約30~150℃で加熱し、保持し、一定に保持しながらリン酸を徐々に加える。可溶性リン酸化グルカン生産物から得る沈降物は約1時間後明らかとなる。バイオ活性生産物の濃度の増大のため約100℃で約3~12時間反応混合物を保持することが好ましい。実際に、約100℃で約4時間の反応後、収率は約70~90%である。可溶性生産物のリン酸化は反応時間で若干変化する(例えば、3時間で1.48%, 6時間で2.23%)。

バイオ活性可溶性リン酸化グルカン生産物は、次のように反応混合物から分離される：その混合物はリン酸化反応停止のために加熱され、は純物を得るために十分な量を蒸留水で希釈される。生じた懸濁液、どのような後置法、濃縮法のため塩、中間、液相は沈降ロートを通して濃縮される。その濃縮は、その後、約10,000ダルトン分子重(MW)より小さい成分の全てを除去するためにモレキュラーシープにかけられた。このように、DMSO、蔗糖、グルコースおよび水溶性リン酸はその濃縮から除去される。モレキュラーシープは、これらの低分子量(すなわち、約10,000ダルトンより小さい)MW成分を除去するいくつかの方法によって濃縮される。ある例においてその濃縮は、約5日間隔に蒸留水に対してスペクトラポ- (Spectrapore) メンブラン透析装置および透析を用いて行われる。他の例においてその濃縮は、10,000ダルトンMWメンブランフィルターおよび大孔径透析管を用いるミリポア (Millipore) グラフィター/コンソレントレータを使用して行われる。モレキュラーシープにかけられた後、生じた濃縮は純粋のような粉末組成物形態の最終可溶性リン酸化グルカンを調製するために濃縮、凍結乾燥される。結晶性濃縮は得られない。

本発明の可溶性リン酸化グルカンの調製方法において使用した中性グルカンは、従来の方法によりサッカロミセスセビシエ根腐菌から得られるであろう「例えは、

シ ルシオ等、1979, インターナショナル ジャーナル オブ キンター 24: 779-789; 引附として含まれたハッシュ等、1941, ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサエティー 63: 296-298(査読を参照のこと) (see e. g., H. Lutz, et al., 1979, Internat'l J. Cancer 24: 779-779; Hestid et al., 1941, J. A. Hest. Soc. 63: 295-298 incorporated herein by reference). 1. 簡単に、実際に中性グルカンは、次のように調製される：乾燥イーストは、水酸化ナトリウム水溶液中で溶かれ、約100℃で約4時間加熱され、そして一夜乾燥される。上澄液はデkantされ、その工程は3回繰り返される。残留物はH₂Oを使用して蒸気化され、加熱され、100℃で約4時間加熱され、そして1時間冷却される。上澄液はデkantされ、濃縮は2回繰り返される。その残留物は、その後、蒸留水で再び洗い洗われる。エタノールで少なくとも24時間抽出される。赤褐色上澄液はその適当な濃度で、捨てられる。エタノール抽出は、上澄液が本質的に無色となまで繰り返される。エタノールは、蒸留水で残留物を繰り返し洗脱することにより除去される。中性グルカンは濃縮分離した濃縮物より得られる。

「分子増殖」として使用するが知られている糖類以外の多くの化合物も、DMSOが中性グルカンの濃縮に使用されるために使用された根、水素結合の